

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-20674

(43)公開日 平成9年(1997)1月21日

(51)IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78	AD Z		A 6 1 K 35/78	AD Z H
	A E D			A E D
A 2 3 G 3/00	1 0 1		A 2 3 G 3/00	1 0 1
A 6 1 K 7/16			A 6 1 K 7/16	
31/56			31/56	
審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 8 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-174571

(22)出願日 平成7年(1995)7月11日

(71)出願人 390002990

株式会社ロッテ

東京都新宿区西新宿3丁目20番1号

(72)発明者 大澤 謙二

埼玉県与野市上峰1-12-12-403

(72)発明者 安田 英之

埼玉県川口市芝1-28-4

(74)代理人 弁理士 浜田 治雄

(54)【発明の名称】 喉炎症起因菌に対する抗菌活性および溶血毒阻害活性を有する口腔用製剤

(57)【要約】

【目的】 喉炎症起因菌(溶血性連鎖球菌)に対する抗菌活性および本菌種の産生する溶血毒阻害活性を有する口腔用製剤を提供する。

【構成】 カリン果実を50~100%低級アルコール水溶液、アセトン、酢酸エチルまたはn-ヘキサン或いはこれらの2種以上の混合溶媒で抽出したエキス、またはこのエキスから抽出したトリテルペン誘導体を含有してなる口腔用製剤。

【効果】 本発明製剤は、副作用の心配がなく、喉炎症起因菌である溶血性連鎖球菌(ストレプトコッカス・ピオゲネス)に対する抗菌活性および本菌種の産生する溶血毒(ストレプトリジンO)阻害活性を有しており、喉の炎症および化膿性疾患等種々の感染症に対して有効に作用するので食品への添加使用等広範な利用に供することができる。

1

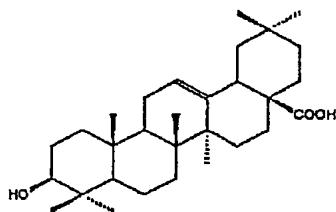
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 カリン果実を50～100%低級アルコール水溶液、アセトン、酢酸エチルまたはn-ヘキサン或いはこれらの2種以上の混合溶媒で抽出したエキスを含有してなり、喉炎症起因菌（溶血性連鎖球菌）に対する抗菌活性および本菌種の産生する溶血毒阻害活性を有することを特徴とする口腔用製剤。

【請求項2】 低級アルコール水溶液がエチルアルコール水溶液であることを特徴とする請求項1に記載の口腔用製剤。

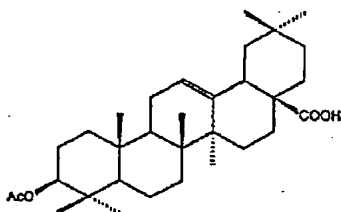
【請求項3】 次に示すトリテルペン誘導体

【化1】



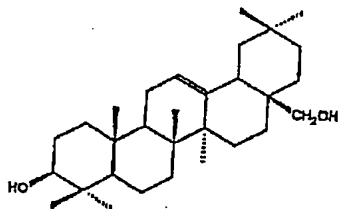
化合物1 オレアノール酸

【化2】



化合物2 3-アセチルオレアノール酸

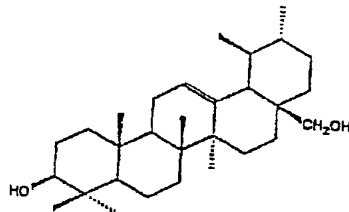
【化3】



化合物3 エリスロジオール

【化4】

2



化合物4 ウバオール

- 10 のいずれか1以上を有効成分としてなり、喉炎症起因菌（溶血性連鎖球菌）に対する抗菌活性および本菌種の産生する溶血毒阻害活性を有することを特徴とする口腔用製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、喉炎症起因菌（溶血性連鎖球菌）に対する抗菌活性および本菌種の産生する溶血毒阻害活性を有する口腔用製剤に関する。

【0002】

- 20 【従来の技術】溶血性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*：ストレプトコッカス・ピオゲネス）は、ヒトの口腔内や咽頭などに分布する通性嫌気性グラム陽性球菌である。本菌は、連鎖球菌の中で最も病原性が強く、粘膜では咽頭炎、扁桃炎、中耳炎等を起こし、皮膚では種々の化膿性炎症を引き起こすことが知られており、いずれも咽頭もしくは扁桃腺において増殖する。

- 【0003】本菌の病原性因子として、溶血毒（ストレプトリジンO）、ディック毒素、ストレプトキナーゼ、DNA分解酵素、ヒアルロニダーゼ等が知られており、咽頭炎、扁桃炎、気管支炎等の呼吸器系疾患の病因的役割を果たしている。

【0004】これらの呼吸器系疾患を予防および治療するためには、病巣において本菌類の生育を阻害することや、菌の病原性因子を抑制することが重要であることはいうまでもない。

【0005】菌の抑制という観点では、本菌類に対して有効な抗菌性物質の応用が効果的である。従来では、ペニシリン系、セフェム系、セファロsporin系の抗生物質が用いられていたが、これらは作用が強力である反面、耐性菌の出現、副作用等から日常的な利用に適しているとはいえない。

【0006】従って、日常的な利用に適する本菌類に有効な抗菌性物質としては、果実、野菜、その他の日常食用に供されている天然物由来のものが好適である。このようなものの例として従来、カリン果実が注目されている。

- 【0007】特開昭59-187769号公報および特開平2-312565号公報は、それぞれ健康増進目的で、カリンを蜂蜜で抽出した果汁乃至エキスを利用する

ことを開示しているが、対象物は蜂蜜で抽出された物に限られており、しかもその効果については甚だ抽象的である。

【0008】また、いずれも本出願人の出願による特開昭62-61538号公報および特開昭62-228230号公報は、カリンの溶剤抽出エキスを *Streptococcus mutans* および *Staphylococcus aureus* に対する抗菌作用があることを開示しているが、ストレプトコッカス・ピオゲネスに対する抗菌活性は明らかにされていない。

【0009】さらに、特公昭63-26083号公報および特開平1-290619号公報は、天然に広く存在するといわれるオレアノール酸等の五環性酸性トリテルペン化合物に抗う蝕作用、即ち *S. mutans* に対する特異的抗菌作用があることを開示しているが、カリン果実にオレアノール酸他の特定の五環性酸性トリテルペン化合物が含まれていることおよびこれらのものにストレプトコッカス・ピオゲネスに対する抗菌活性があることは開示していない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、天然物の溶媒抽出物を試料とし、ストレプトコッカス・ピオゲネスに対する抗菌活性および本菌の産生する溶血毒（ストレプトリジンO）阻害活性を指標としてスクリーニングを行った結果、カリン果実の溶媒抽出物にそれらの効果があることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、カリン果実を50～100%低級アルコール水溶液、アセトン、酢酸エチルまたはn-ヘキサン或いはこれらの2種以上の混合溶媒で抽出したエキスおよびこのエキスより得られるトリテルペン誘導体を含む含有してなり、喉炎症起因菌（溶血性連鎖球菌）に対する抗菌活性および本菌種の産生する溶血毒阻害活性を有する口腔用製剤である。

【0012】本発明口腔用製剤の原料となるカリン（*Chaenomeles sinensis*, *Cydonia sinensis*, *Pseudocydonia sinensis*）は、バラ科、中国原産の植物で世界各地で栽培されている落葉の高木であり、その果実は食品素材として用いられる他、漢方で木瓜（モッカ）と呼ばれ、焼酎で薬用酒としたものが鎮咳、去痰の目的で用いられている。しかしながらその有効成分は不明であり、またどのような作用機作により鎮咳、去痰の効果を発現するのかも不明である。

【0013】本発明口腔用製剤は、以下のようにしてカリン果実より抽出製造することができる。

【0014】先ず、カリン果実をそのまま或いは乾燥させた後、適当な手段で機械的に粉碎し、これに50～1

00%低級アルコール水溶液、好ましくはエタノール水溶液、アセトン、酢酸エチルまたはn-ヘキサン或いはこれらの2種以上の混合溶媒を充分量適用して抽出操作を行う。これらの溶媒は市販されている通常のもを使用すればよく、また混合溶媒は、これらの2種以上を任意に選択し、任意の混合割合で混合して使用すればよい。抽出操作は、粉碎したカリン果実を、常温で前記溶媒に適当時間浸漬する方法によってもよいが、好ましくは50～100℃の温度で1～5時間、一層好ましくは約3時間かけて加熱還流する方法で行う。

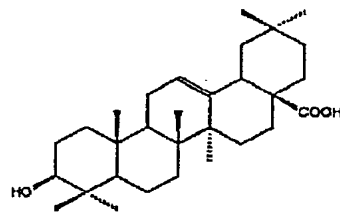
【0015】次に、このようにして得られる抽出液を、減圧濃縮することにより本発明口腔用製剤が得られる。

【0016】このようにして得られた組成物を、さらにカラムクロマトグラフィーに付し、分離精製を行う。用いるカラムクロマトグラフィーは任意であり、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、或いは高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等の技法を用いればよい。また、用いる展開液はメタノール等の低級アルコール、これの水溶液、アセトン、酢酸エチルまたはn-ヘキサン等でよい。得られる分離精製物は、本発明のもう一つの口腔用製剤を構成するトリテルペン誘導体である。

【0017】本発明にかかるトリテルペン誘導体は、次の構造を有している。

【0018】

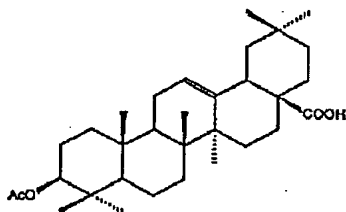
【化5】



化合物1 オレアノール酸

【0019】

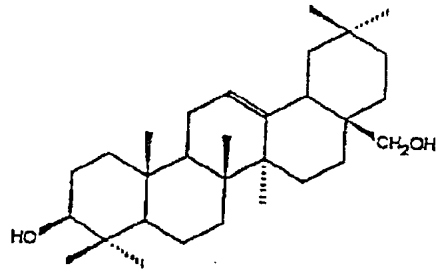
【化6】



化合物2 3-アセチルオレアノール酸

【0020】

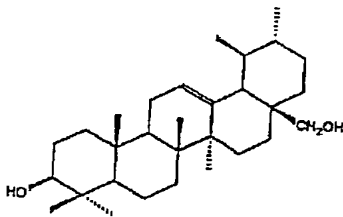
【化7】



### 化合物3 エリスロジオール

【0021】

【化8】



### 化合物4 ウバオール

【0022】本発明口腔用製剤では、これらの誘導体のいずれか1以上を有効成分として使用する。

【0023】このようにして得られる溶媒抽出組成物およびトリテルペン誘導体である本発明口腔用製剤は、広範な用途に用いることができるが、特にその香り、呈味性が優れ、安全性が高いことを考慮すれば、チューインガム、キャンディ、錠菓、含そう剤などに配合して日常的な利用に供することもできる。このような用途に供する場合、本発明口腔用製剤を、製品中に0.01~10重量%の割合で含有するように添加すれば好適である。

【0024】以下、本発明の実施例、試験例および応用例を挙げて説明する。

【0025】

【実施例】

#### 実施例1

カリン乾燥果実粉砕物1kgに50%エタノール5リットルを加え、100℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮し、溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤324gを得た。

#### 【0026】実施例2

カリン乾燥果実粉砕物1kgに100%エタノール5リットルを加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮し、溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤77gを得た。

#### 【0027】実施例3

カリン乾燥果実粉砕物1kgにアセトン5リットルを加

え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮し、溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤45gを得た。

#### 【0028】実施例4

カリン乾燥果実粉砕物1kgに酢酸エチル5リットルを加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮し、溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤35gを得た。

#### 【0029】実施例5

カリン乾燥果実粉砕物1kgにn-ヘキサン5リットルを加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより酸味および芳香を有する淡緑色の固形物である本発明製剤5gを得た。

#### 【0030】実施例6

生食用カリン果実の粉砕物1kgに50%エタノール3リットルおよびアセトン2リットルの混合溶媒を加え、100℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤280gを得た。

#### 【0031】実施例7

生食用カリン果実の粉砕物1kgに100%エタノール3リットルおよび酢酸エチル2リットルの混合溶媒を加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤82gを得た。

#### 【0032】実施例8

生食用カリン果実の粉砕物1kgに100%エタノール3リットルおよびn-ヘキサン2リットルの混合溶媒を加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤72gを得た。

#### 【0033】実施例9

カリン乾燥果実粉砕物1kgにアセトン3リットルおよ

び酢酸エチル2リットルの混合溶媒を加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤58gを得た。

#### 【0034】実施例10

カリンドロ果実粉砕物1kgにアセトン3リットルおよびn-ヘキサン2リットルの混合溶媒を加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤42gを得た。

#### 【0035】実施例11

カリンドロ果実粉砕物1kgに酢酸エチル3リットルおよびn-ヘキサン2リットルの混合溶媒を加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤35gを得た。

#### 【0036】実施例12

カリンドロ果実粉砕物1kgに100%エタノール1リットル、アセトン1リットル、酢酸エチル1リットルおよびn-ヘキサン2リットルの混合溶媒を加え、80℃の温度で3時間加熱還流抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を減圧下、濃縮して溶媒を除去することにより、酸味および芳香を有する赤褐色の固形物である本発明製剤63gを得た。

#### 【0037】実施例13

実施例2で得られた本発明製剤の60gに水を加えて分散させた後、酢酸エチルで分配し、酢酸エチル可溶画分(17.1g)を得た。

【0038】この酢酸エチル可溶画分をシリカゲル(ワコーゲルC-200、和光純薬)1kgを充填したカラ\*

＊ムに吸着させた。このカラムをn-ヘキサン酢酸エチル(10:1~1:1)にて溶出させ、分画を行った。TCLプレート(60F254、メルク)を用いてn-ヘキサン-酢酸エチル(2:1)で展開した時、Rf値0.2~0.5付近に10%硫酸により青または紫色のスポットを呈する画分を集めた。

【0039】この画分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用のオクタデシルシラノール型(ODS)分取カラム(センシュー科学)を用いて、メタノール-水(90:10~100:0)で溶出させ、205ナノメータのUV吸収をモニターしながら各ピークを分取する。

【0040】それぞれのピークはさらにHPLC用ODSカラムを用いてアセトニトリル-水(95:5~100:0)、メタノール-水(90:10~100:0)で繰り返し精製することにより、本発明製剤である4種類の無色結晶性化合物1(2850mg)、化合物2(250mg)、化合物3(25mg)、化合物4(25mg)を得た。

【0041】これらの化合物について、融点、マススペクトル、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルにより分析した結果、前記化合物1~4はオレアノール酸、3-アセチルオレアノール酸、エリスロジオールおよびウバオール等のトリテルペン誘導体であることを確認した。

#### 【0042】試験例1

実施例1~5および13で示した方法により調製した本発明製剤の溶血性連鎖球菌、黄色ブドウ球菌および腐原因菌に対する抗菌活性を以下の方法により試験した。

#### 【0043】試験方法

##### 1) 供試菌株、使用培地および培養条件

#### 【0044】

【表1】

供試菌株		使用培地
・溶血性連鎖球菌		
1. ストレプトコッカス・ピオゲネス	ATCC12348株	A
2. ストレプトコッカス・ピオゲネス	ATCC19615株	A
・黄色ブドウ球菌		
3. スタフィロコッカス・アウレウス	11D975株	B
4. スタフィロコッカス・アウレウス	11D671株	B
・腐原因菌		
5. ストレプトコッカス・ミュータンス	Ingbritt株	A
使用培地		
A: ブレイン・ハート・インフュージョンブロス		
B: 酵母エキス(5mg/ml) グルコース(1g/ml) 添加ニュートリエントブロス		

し、菌を十分に生育させる。96穴平底マイクロプレートを用い、各ウエル中で試料溶液(100 $\mu$ l)の2倍希釈系列を調製する。2倍濃度で調製した培地に各々の菌を接種し、その100 $\mu$ lを各ウエルに添加する。24時間培養した後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウエルの濁度(550nm)を測定し、菌の生育を判定し、その最小発育阻止濃度(MIC)を求める。

#### 【0046】試験結果

試験結果を表2に示す。本発明製品(実施例1~5および

\*び化合物1~4)は、黄色ブドウ球菌や溶血性連鎖球菌に対しても抗菌活性を示すが、溶血性連鎖球菌に対する抗菌活性は、さらに強いものである。カリンの水や30%エタノール抽出物では本発明製品のような抗菌活性はみられなかったことから、カリンを抽出する場合のエタノール濃度は、50%以上でなくてはならないことが明らかである。

#### 【0047】

【表2】

表 2

試料	最小発育阻止濃度(MIC: $\mu$ g/ml)				
	溶血性連鎖球菌		黄色ブドウ球菌		溶血原因菌
	1	2	3	4	
カリン水抽出物	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
カリン30%エタノール抽出物	>3200	>3200	>3200	>3200	>3200
カリン50%エタノール抽出物(具体例1)	400	400	1600	1600	1600
カリン100%エタノール抽出物(具体例2)	200	200	1600	1600	1600
カリンアセトン抽出物(具体例3)	200	200	1600	1600	1600
カリン酢酸エチル抽出物(具体例4)	100	100	800	800	800
カリンn-ヘキサノール抽出物(具体例5)	100	100	800	800	800
化合物1	6.25	6.25	200	200	200
化合物2	100	100	400	400	400
化合物3	100	100	400	400	400
化合物4	12.5	100	200	200	200

1. S. ヒオグネス ATCC12348  
2. S. ヒオグネス ATCC19515  
3. S. アウレウス I10975

4. S. アウレウス I10671  
5. S. ミュータンス Ingbritt

#### 【0048】試験例2

実施例1~5および13で示した方法により調製した本発明製剤の溶血毒(ストレプトリジンO)阻害活性を以下の方法により試験した。

#### 【0049】試験方法

ウサギ脱繊維血液25mlを緩衝食塩水(pH6.5)で3回洗浄(3000rpm $\times$ 10分間)し、赤血球を集める。緩衝食塩水で200mlに希釈し、ウサギ赤血球浮遊液とする。試料規定量をエタノールに溶解してから、さらに緩衝食塩水に溶解し(エタノール2%)、試料溶液とする。試料溶液600 $\mu$ lとストレプトリジンO(栄研)水溶液(1結合力価)300 $\mu$ lを13mm径の試験管中で混合し、37 $^{\circ}$ Cで30分反応させる。ウサギ赤血球浮遊液300 $\mu$ lを添加し、37 $^{\circ}$ Cで45分間反応させる。反応終了後、1500rpmで1分間遠心分離し、上清の溶血度合を肉眼で判定する。判定基準

は次のようにした。

- 30 【0050】判定基準 - : 溶血のみみられないもの、  
+ : 不完全溶血、++ : 完全溶血

#### 【0051】試験結果

試験結果を表3に示す。本発明製剤(実施例1~5および化合物1~4)は、溶血毒阻害活性を示し、1000 $\mu$ g/ml濃度では、いずれの試料でも溶血を完全に阻害した。100 $\mu$ g/ml濃度においても阻害活性を示し、完全溶血を起こすものはみられなかった。抗菌活性と同様に、カリンの水や30%エタノール抽出物では本発明製剤のような溶血毒阻害活性はみられなかったことから、カリンを抽出する場合のエタノール濃度は、50%以上でなくてはならないことが明らかである。

#### 【0052】

【表3】

表 3

試料	濃度 (μg/ml)		
	1000	100	10
カリン水抽出物	++	++	++
カリン30%エタノール抽出物	++	++	++
カリン50%エタノール抽出物 (具体例1)	-	+	++
カリン100%エタノール抽出物 (具体例2)	-	-	++
カリンアセトン抽出物 (具体例3)	-	-	+
カリン酢酸エチル抽出物 (具体例4)	-	-	+
カリンn-ヘキサン抽出物 (具体例5)	-	-	-
化合物1	-	-	+
化合物2	-	-	++
化合物3	-	+	++
化合物4	-	+	++

- : 溶血は見られない    + : 不完全溶血    ++ : 完全溶血

## 【0053】応用例

実施例1、2および13で示した方法により調製した本発明製剤を用いて、次の処方によりチューインガム、キャンディ、錠菓、含そう剤を製造した。

## 【0054】

## 1. チューインガムの処方

ガムベース	20.0%
砂糖	55.0
グルコース	15.0
水飴	9.3
香料	0.5
本発明製剤 (実施例1)	0.2
	100.0%

## 【0055】

## 2. キャンディの処方

砂糖	50.0%
水飴	34.0
クエン酸	1.0
本発明製剤 (実施例2)	0.2
水	14.8
	100.0%

## 【0056】

## 3. 錠菓の処方

砂糖	76.4%
グルコース	19.0
ショ糖脂肪酸エステル	0.2
本発明製剤 (化合物1)	0.2
水	4.2
	100.0%

## 【0057】

## 4. 含そう剤の処方

エタノール	30.0%
香料	1.0
銅クロロフィリンナトリウム	0.1
サッカリン	0.05
塩酸クロルヘキシジン	0.01
本発明製剤 (化合物1)	0.2
水	68.64
	100.0%

## 30 【0058】

【発明の効果】本発明口腔用製剤は、喉炎症起因菌である溶血性連鎖球菌 (ストレプトコッカス・ピオゲネス) に対して特異的に強い生育阻害効果を有するばかりでなく、本菌種の産生する溶血毒 (ストレプトリジンO) に対する阻害効果を併せ有しており、喉の炎症および化膿性疾患を始め種々の感染症に対して有効に作用する。

【0059】本発明口腔用製剤の原料であるカリンは食用素材や薬用酒として用いられており、その安全性については問題がないので本発明口腔用製剤の安全性にも問題がなく、従って抗生物質を応用した場合にみられる副作用等の心配はないと認識される。

【0060】本発明口腔用製剤は、副作用等の心配はなく、香り、呈味性が優れているので食品への添加使用等、広範な利用に供することが可能な汎用性の高いものである。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 J	1/00		C 0 7 J	1/00
// A 2 3 G	3/30		A 2 3 G	3/30
A 2 3 L	1/30		A 2 3 L	1/30
				B